

Gıda Mikrobiyolojisinde Kullanılan Yöntemlerin Laboratuvar Akreditasyonu

Sibel Özkök^a Ahmet Koluman^{a*} Zeynep T. Burkan^a
H. Duygu Çalım^a Atanur Tezel^a E. Nazan Akçelik^a

Geliş Tarihi: 01.07.2011

Kabul Tarihi: 09.01.2012

Özet: Genel bir anlatım ile akreditasyon; laboratuvarların, muayene ve belgelendirme kuruluşlarının ulusal ve uluslararası kabul görmüş teknik kriterlere göre değerlendirilmesi, yeterliliğinin onaylanması ve düzenli aralıklarla denetlenmesi olarak tanımlanabilir. Bu kapsamda yapılan denetlemeler ISO 17025'e göre idari ve laboratuvar genel şartları, analiz koşulları, analize ait tüm parametreler olmak üzere iki ana başlıkta gerçekleştirilir. Akreditasyon kapsamında yapılan tüm analizlerin güvenilir ve doğruluğu yüksek sonuçlar verdiği gözlemlenmektedir. Ülkemizde gıda üretimi ve dağıtımında resmi veya özel kontrol kurumlarının akreditasyona verdiği öneme bağlı olarak toplam gıda güvenliğinde belirgin bir yükselme kaydedilebilecektir. Bu derleme içerisinde akreditasyon ve akreditasyona ait tanımlar özetlenecektir.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyoloji, Gıda, Akreditasyon, ISO 17025

Laboratory Accreditation of Methods Used in Food Microbiology

Abstract: As a general term, accreditation is the evaluation of the laboratories by national and international control and certification bodies, approval of proficiency, audit in regular intervals. In this context audit is held according to ISO 17025 under two main titles including supervisory, general terms and analysis parameters. Accredited analysis are accepted to have certainty and accuracy. As the importance of accreditation taken into account by official and private laboratories, a significant improvement in food safety will be recorded. This review includes accreditation and summary of terms related to accreditation.

Key Words: Microbiology, Food, Accreditation, ISO 17025

Giriş

Gıdalardan kaynaklanan infeksiyon ve intoksikasyonların halk sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi ve neden olduğu ekonomik kayıp gün geçtikçe artmaktadır. Bu olumsuzlukların giderilmesi için gıda kontrol sistemleri kurulmakta ve bu sistemler içerisinde mevcut analizleri yürüten laboratuvarların akreditasyonu zorunlu kılınmaktadır. Genel bir anlatım ile akreditasyon; laboratuvarların, muayene ve belgelendirme kuruluşlarının ulusal ve uluslararası kabul görmüş teknik kriterlere göre değerlendirilmesi, yeterliliğinin onaylanması ve düzenli aralıklarla

denetlenmesi olarak tanımlanabilir³. Bu kapsamda yapılan denetlemeler ISO 17025'e göre idari ve laboratuvar genel şartları, analiz koşulları, analize ait tüm parametreler olmak üzere iki ana başlıkta gerçekleştirilir³. Türkiye'de akreditasyon konusunda atılan en önemli adım, 4 Kasım 1999'da Resmi Gazete'de yayınlanan "Türk Akreditasyon Kurumu Kuruluş ve Görevleri Hakkında Kanun" ile Türk Akreditasyon Kurumu'nun (TÜRKAK) kuruluşu olmuştur¹. Bu kanun kapsamında TÜRKAK, laboratuvar, belgelendirme ve muayene hizmetlerini gerçekleştiren ve gerçekleştirecek olan yurtiçi ve yurtdışı kuruluşlarını akredite etmek, bu kuruluşların belirlenen ulusal ve uluslararası standartlara

^a Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Fatih Sultan Mehmet Bulvarı No:70, 06170 Yenimahalle, Ankara, Türkiye

* E-posta: ahmetkoluman@hotmail.com

göre faaliyetlerde bulunmalarını ve bu suretle ürün/hizmet, sistem, personel ve laboratuvar belgelerinin ulusal ve uluslararası alanda kabulünü sağlamakla görevlendirilmiştir.

Akreditasyon İçin Gerekli Şartlar

Mikrobiyoloji laboratuvarı akreditasyonu için gerekli şartlar yerine getirilmedikçe, mikrobiyolojik analizlerde akreditasyon belgesi almak mümkün değildir^{2,8}. Akreditasyon için gerekli koşullar aşağıda belirtilmiştir.

Laboratuvar Personeli

Mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirecek personelin bu alanda yetkin olması istenir. Bu kapsamda analizi gerçekleştirecek kişilerin numune kabul etme, numune hazırlama, besiyeri hazırlama ve analizi gerçekleştirme aşamalarını takiben atıkların imhası konusunda yeterli bilgi birikimi ve tecrübeye sahip olması gerekir. Mikrobiyolojik analizlerde yer alacak tecrübesi olmayan personelin yetkilendirilmesi, yetkin personel tarafından gerekli eğitimi takiben yapılır. Eğitimlerin içeriği ve süresi ihtiyaca göre değişiklik göstermektedir².

Laboratuvarın Çevresel Koşulları

Mikrobiyoloji laboratuvarının fiziksel ortam tasarımı, mikrobiyolojik analizlerin gerçekleştirilmesinde en önemli etkenlerdendir^{3,6,8}. Çevresel faktörler şu şekilde sıralanabilir:

Alt Yapı

Mikrobiyolojik analizlerin yapılacağı laboratuvar, biyogüvenlik seviyesine göre sadece yetkilendirilmiş personelin girişine izin veren, laboratuvar birimleri birbirinden bağımsız olacak şekilde ve ofis, giyinme odası, depo, arşiv, vb. girişi kontrollü olarak düzenlenmelidir. Laboratuvar tasarımı örneklerin çapraz bulaşmasına izin vermeyecek şekilde temizden kirliye doğru akış şemasında hazırlanmalıdır. Bu amaçla her alanda kullanılan ekipmanın ayrılması ve farklı amaçlarla kullanılan ekipmanların karıştırılmaması gerekmektedir. Moleküler analiz yapılan alanlar ISO 22174'e göre tasarlanmalı ve çalışma alanları fiziksel olarak;

1. Nükleik asit ekstraksiyonu,
2. Mastermiks hazırlama ,
3. Mastermiks ve nükleik asitin karıştırılması ve
4. PCR ürünlerinin belirlendiği ve doğrulandığı alanlar olmak üzere dört ayrı bölümden oluşmalıdır³.

İşlemler sürece veya alana göre düzenlenebilmektedir. Bulaşmanın azaltılması amacı ile

duvar, yer, tavan ve tezgah asit ve sıcaklığa dayanıklı, pürüzsüz yüzeyden oluşmalıdır. Birleşme yeri temizliğe izin verecek şekilde yuvarlatılmalıdır. Analizlerin yapıldığı alanlarda pencerelerin aydınlatma özelliğinden faydalanılmı, havalandırma amacıyla kullanımı sınırlandırılmalıdır. Kapıların açılma yönleri analizin yürütüldüğü alana dışarıdan minimum hava girişine izin verecek şekilde tasarlanmalıdır. Güneşlikler camların dışında bulunmalı, mümkünse ikili cam sisteminin arasına yerleştirilmelidir. Dolaplar tavana kadar olmalı ve toz tutunma yüzeyi azaltılmalıdır.

Çevre İzleme

Laboratuvarda mevcut çevresel bulaşma yüzeylerden svap alarak, etüvler rodak plaklarla, ve ortam havası, hava kontrol cihazları ile sürekli izlenmeli, kabul edilebilir mikroflora sayısı belirlenerek bu sınırlara uyulmalıdır.

Hijyen ve Biyogüvenlik

Laboratuvarda olası biyogüvenlik riskleri belirlenerek bu konuda bir talimat hazırlanmalıdır. Bu talimatta, çapraz bulaşma olması halinde uygulanacak önlemler belirlenmeli ve personel bu konuda eğitilmelidir. Laboratuvarda toz kaynağı olabilecek her türlü eşya ve personele ait doküman için bağımsız bir arşiv alanı oluşturulmalıdır. Personelin giyimi analize uygun olmalıdır. Biyogüvenlik talimatına uygun olarak laboratuvarın biyogüvenlik seviyesine göre personel için gerekli koruyucu önlemler alınmalıdır.

Yöntemlerin Validasyon Durumu ve Verifikasyonu

Akreditasyon için seçilen analizlerde öncelikle uygun yöntemin belirlenmesi geçerli kılınması (validasyon) ve doğrulanması (verifikasyon) gerekmektedir^{2,5,7,11}.

a. Validasyon (Geçerli kılma)

Bir yöntemin validasyonu, yonteme ait tüm parametrelerin belirlenmesi ile gerçekleştirilir. Validasyon aşamasında yöntemin o mikroorganizmaya özgüllüğü (specifity), kantitatif yöntemlerde kalibrasyon ve standart eğrisinin belirlenmesini takiben kesinliği (precision), doğruluğu (truness), konsantrasyon aralığının ve ölçüm aralığının belirlenmesi, tespit sınırının ortaya konulması, sayım sınırının belirlenmesi, sağlamlığı (ruggedness) ölçülerek değerlendirilir. Validasyon sonucunda elde edilen veriler o patojenin valide edilen yöntemle doğru bir şekilde analiz edilip edilmediği bilgisini verir.

b. Verifikasyon (Doğrulama)

Tek bir laboratuvarın validasyon verilerine uygun olacak biçimde analiz yöntemi uygulamalarını içerir. Verifikasyon, validasyona benzemesine rağmen birçok anlamda yöntemin laboratuvar koşullarında uygulanmasını içerdiğinden validasyonda incelenen parametreler kadar fazla sayıda parametre içermemektedir. Verifikasyon sonucunda valide yöntemin laboratuvar koşullarında uygulanmasının mümkün olup olmadığı bilgisi elde edilir.

c. Analiz Yönteminin Seçimi

Gıda mikrobiyolojisine yönelik sonuç veren laboratuvarlar uluslar arası onay gören ISO veya FDA gibi standart yöntemleri tercih etmektedir. Bu kapsamda gıda mikrobiyolojisi analizcilerinin seçimini yönlendiren temel olgu yöntemin validasyonunun yapılmış olmasıdır.

Norveç Gıda Analiz Komitesi (Nordic Committee on Food Analysis-NMKL)⁷ tarafından yayınlanan prosedüre göre, validasyon işleminde izlenecek yöntemler Tablo.1de tanımlanmaktadır. Kullanılacak yöntemin seçilmesinde öncelikli konu ilk sütunda gösterilmektedir.

Tablo 1. Seçilen yöntemin validasyonuna göre laboratuvar içi verifikasyon gereksinimleri

Table 1. Internal verification needs of a laboratory according to the validation status of the method chosen.

	Yöntemin Dış Validasyon Durumu	Önerilen İç Verifikasyon
1.	Laboratuvarlar arası çalışma ile validasyonu tamamlanmış yöntem	Doğruluk (truness) ve kesinliğin (precision) verifikasyonu
2.	Laboratuvarlar arası çalışma ile validasyonu tamamlanmış yöntemin yeni bir cihaz veya farklı bir gıda türünde (matris) çalışılması	Doğruluk ve kesinliğin verifikasyonu ve kantitatif yöntemlerde sayım limitinin belirlenmesi
3.	Yöntem tanımlanmış ancak laboratuvarlar arası çalışma ile validasyonu yapılmamıştır	Yöntem verifikasyonu ve laboratuvar içi validasyon
4.	Yöntem bilimsel yayında yer almakta ve güvenilir performans özellikleri göstermektedir	Yöntem verifikasyonu ve laboratuvar içi validasyonunun yapılması
5.	Yöntem bilimsel yayında yer almakta ve güvenilir performans özellikleri gösterilmiştir	Laboratuvar içi tam validasyon
6.	Yöntem analizi yapan laboratuvarda geliştirilmiştir	Laboratuvar içi tam validasyon

Validasyon ve verifikasyon işlemleri mevcut analiz koşulları altında yapılmalıdır. Bu işlemler doğal kontamine örneklerle yapılabildiği gibi deneysel olarak kontamine edilmiş (spike) örneklerle de yapılabilir. Analistler de-

neysel olarak kontamine edilmiş numunelerde bulaşmanın yüzeysel olarak kaldığını ve matris etkisinin düşük seviyede olduğunu bilmelidirler. Numunelerin kontaminasyon düzeyi kantitatif analizlerde düşük (1-10 kob/ml) orta (50-100 kob/ml) ve yüksek (500-1000kob/ml) olarak yapılmaktadır. Analizler minimum 7, maksimum 10 tekrarlı yapılmalıdır. Her deneysel olarak kontamine edilmiş 10 örnek için 10 adet negatif örnek incelenmelidir. Kalitatif testlerde sadece düşük ve orta seviyeler kullanılmaktadır. Verifikasyon işlemi minimum 2 analist ile gerçekleştirilir. Analizler, ISO 19036:2006'ya göre dört farklı matris grubunda yapılmalıdır⁵. Analizlerde kullanılacak matris grupları ilgili dokümanın: Ek A/ 2. maddesinin 2. kısmında şu şekilde tanımlanmaktadır:

1. Grup: Sıvılar ve tozlar (süt, süt tozu, bebek maması, meyve suyu, toz baharat, partikülsüz hazır toz çorbalar vb.)
2. Grup: İyi karıştırılmış katılar: kıyma, mekanik ayrılmış kıyma, köfte karışımları, sütlü dondurma, kaymak, krema, soya sütü, eritme peynir, lor, parçalı baharat vb.)
3. Grup: Küçük katılar (doğranmış sebze, rendelenmiş sebze, karides, mısır gevreği, yem, kırılmış fındık, çökelek vb.)
4. Grup: Diğer katılar (iri kuşbaşı, tavuk eti,, peynir, makarna, parçalanmamış yeşillik, vb.)

Kalitatif testlerde verifikasyon için toplam analiz sayısı şu şekilde belirlenir:

1 analist için 4 matrisin her birinde iki farklı kontaminasyon seviyesinde olmak üzere,10 pozitif ve 10 negatif örnek çalışılır. Bu kapsamda bir analistin verifikasyonu için 160 analiz gerçekleştirmesi gerekmektedir. Elde edilen veriler tabloya yerleştirilerek verifikasyon için gereken değerlendirmeler yapılmaktadır.

Ölçüm Belirsizliği

Kantitatif analizlerde çevreden, ekipmandan, matristen, analistten kaynaklanan ve sonucu etkileyen parametreler,sayısal sonuç verilen analizlerde belirsizlik olarak göz önüne alınır. Bunların belirlenmesi ve analiz sonucuna yansıtılmasını içeren ölçümlerin tamamı "ölçüm belirsizliği" olarak tanımlanmaktadır^{5,8,10}.

Ekipman

ISO 17025 içerisinde 5.5 maddesi kapsamında laboratuvarında mevcut tüm cihazların, kalite sistemi uyarınca izlenmesi zorunlu olup,

bakım, kalibrasyon ve performans ölçümleri düzenli olarak yapılmalıdır³.

Bakım

Cihazların periyodik bakım ve arızaları kayıt altına alınmalı ve izlenebilir olmalıdır. Cihazlarda meydana gelebilecek çapraz kontaminasyona karşı alınan tedbirler kayıt altına alınmalı ve izlenmelidir.

Kalibrasyon ve Performans Ölçümü

Test sonuçları üzerinde doğrudan etkisi olduğu için her türlü cihaz ve ekipmanın kalibrasyonu yapılmalı, izlenmeli, istenen performansın sağlanması için gerekli önlemler alınmalı ve tüm işlemlere ait kayıtlar düzenli olarak tutulmalıdır. Ortam sıcaklığı kalibreli derecelere izlenmelidir. İnkübatör, su banyosu, terazi, sterilizatör, otoklav, günlük terazi kontrol ağırlıkları, hacim ölçüm ekipmanı, laminar air flow ve diğer tüm cihazların belirlenen aralıklarla kalibrasyonları yapılmalı, günlük izlemeleri kaydedilmeli ve performansları kayıt altına alınmalıdır.

Kimyasal ve Besiyerleri

ISO 17025'de 4.6 ve 5.5 maddelerinde açık olarak bildirilen ve sonuçlar üzerine doğrudan etkisi olan laboratuvar aşamaları kontrol edilmeli ve bu kontroller kayıt altına alınmalıdır³.

Kimyasallar

Tüm kimyasalların raf ömürleri kayıt altına alınmalı ve süreleri dolduğunda uygun şekilde imha edilmelidir².

Laboratuvarda Hazırlanan Besiyerleri

Toz besiyerleri; nemsiz, oda sıcaklığında, karanlıkta depolanır. Besiyerlerine katılan katkıları, üretici firmanın önerdiği buzdolabı sıcaklığında depolanmalıdır. Laboratuvarda hazırlanan besiyerleri için aşağıdaki kontroller mutlaka yapılmalıdır².

Hedef olmayan mikroorganizmaların inhibisyonu,

Tanımlayıcı ve ayırt edici özelliklerinin bakteri morfolojisi yönünden değerlendirilmesi,

Fiziksel özelliklerinin değerlendirilmesi (renk, kıvam, homojenite),

Her hazırlanan besiyeri için hedef mikroorganizmanın gelişme performansının izlenmesi.

Kullanıma Hazır Besiyerleri

Hazır besiyerlerinin her üretim grubu (lot) için performans testleri yapılmalıdır. Aynı zamanda gelen hazır besiyerine ait raf ömrü, içerik bilgisi, depolama koşulları, sterilite kontrolü yapılmalıdır².

Etiketleme

Tüm kimyasallar ve besiyerleri etiketlenmeli, etiketler üzerinde hazırlanma ve son kullanım tarihleri olmalıdır^{2,4}.

Referans Malzeme ve Sertifikalı Referans Kültür

ISO 17025 5.6.3. maddesi uyarınca sonuçların doğruluğunu göstermek, laboratuvar performansını izlemek, yöntem verifikasyonu, validasyonu ve yöntem karşılaştırma çalışmaları için referans malzemeler kullanılmalıdır³.

Sertifikalı referans kültürlerin kullanımı, saklanması ve pasajlanması için ISO 11133-1'de bildirilen yöntemler kullanılmalıdır. Analizlerde kullanılacak her türlü malzeme için sertifikalı kültür ile performans testi yapılmalı ve negatif kontrolü ile kıyaslanarak kayıt altına alınmalıdır⁹.

Sonuç

Akreditasyon zor ve emek isteyen bir süreçtir. Ancak akreditasyon ile izlenebilirliği artan laboratuvarların daha güvenilir sonuç verdiği ve elde edilen sonuçların doğruluk oranının daha yüksek olduğu kabul edilmektedir. Şüphesiz ki izlenebilirlik, herhangi bir sorun oluşması halinde geriye dönük iyileştirici tedbirlerin alınmasını sağlamaktadır. Böylece analiz sonuçları daha gerçekçi ve daha güvenilir olmaktadır. Gıda kontrol süreci içerisinde gıda mikrobiyolojisi çalışan laboratuvarlar arası yöntem birlikteliği olması, kullanılan yöntemlerin validasyonunun ve verifikasyonunun yapılması gerek tüketici, gerekse üreticinin haklarının korunması bakımından önemlidir. Mikrobiyolojik analizlerde akreditasyon, çiftlikten sofraya gıda güvenliğinin en önemli noktalarından birisi olan kontrol aşamasında daha gerçekçi sonuçlar verilmesini ve halkın sağlıklı, güvenilir gıda tüketimini sağlamayı hedefler.

Ülkemiz coğrafi koşullarından dolayı çeşitli gıdaların üretimine uygun yapı göstermektedir. Ürünlerin kalitesi yükseltilmeye çalışılmakta bu amaçla birçok tedbir alınmaktadır. Ürünlerin mikrobiyolojik kalitesinin izlenmesinde güvenilir sonuç vermek üretici ve tüketici

için büyük önem göstermektedir. Akreditasyon kapsamında yapılan tüm analizlerin güvenilir ve doğruluğu yüksek sonuçlar verdiği gözlemlenmektedir. Ülkemizde gıda üretimi ve dağıtımında resmi veya özel kontrol kurumlarının akreditasyona verdiği öneme bağlı olarak toplam gıda güvenilirliğinde belirgin bir yükselme kaydedilebilecektir. Meydana gelmesi beklenen toplam kalite artışı ile ihracat ekonomisi üzerinde olumlu etkiler gözlemlenebileceği gibi, ek olarak ülkemize ithal edilen gıda ürünlerinin kontrolü de sağlanarak halk sağlığı yönünden belirgin bir katma değer sağlanacaktır.

Kaynaklar

1. Anonim, (1999). Türk Akreditasyon Kurumu Kuruluş ve Görevleri Hakkında Kanun. Resmi Gazete. Kanun No. 4457 Kabul Tarihi: 27.10.1999
2. Anonim (2002). Accreditation for microbiological laboratories. EA-04/10. Rev02. European cooperation for accreditation.
3. Anonim, (2005a). Mikrobiyoloji laboratuvarlarının akreditasyonu-“TS EN ISO/IEC 17025 Deneysel ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar” standardının uygulanması rehberi. ICS 01.020; 01.120. Türk Standartları Enstitüsü Türkiye.
4. Anonim, (2005b). ISO22174: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food borne pathogens-General requirements and definitions. Licence no:9897377091. Switzerland.
5. Anonim, (2006). ISO/TS 19036. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Licence no:/5957476001. Switzerland.
6. Anonim, (2007). Requirements for the estimation of measurement uncertainty. National Pathology Accreditation Advisory Council. Online ISBN:1741861659.
7. Anonim, (2009a). Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Procedure No.4. Validation of chemical analytical methods. N-0106, Norway.
8. Anonim, (2009b). Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NordVal National Veterinary Institute. Norway
9. Anonim, (2009c). ISO 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Licence no:/7681349013. Switzerland.
10. Forster, L.I. (2003). Measurement of uncertainty in microbiology. *Journal of AOAC International*. 86,1089-1094.
11. Niemela, S.I. (2002). Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Centre for metrology and accreditation. Advisory Commission for Metrology. Publication J3/2002.

